野生茯苓鉴定及其木质纤维素降解酶系研究

覃雯[1]，尹立伟[1*]，胡婷[1]，杨春成[1]，武琳[2]，黄祝[1]，胡雅楠[1]

(1. 安庆师范大学 生命科学学院，皖西南生物多样性研究与保护安徽省重点实验室，安徽 安庆 246133；

2. 安庆师范大学 化学化工学院，安徽省功能配合物重点实验室，安徽 安庆 246011)

摘要：为揭示茯苓木质纤维素降解酶系及培养方式对其主要酶系的影响，该研究测定了茯苓主要木质纤维素降解酶系。首先对野生茯苓菌株进行培养特性的显微观察；再利用 3 对引物 PCR 扩增进行系统发育学的鉴定；经定性培养筛选出优势菌株 YX1，最后采用酶标仪测定不同条件下纤维素酶、半纤维素酶和木质素降解酶的活力大小。结果表明:（1)茯苓有菌丝体、子实体和菌核 3 种形态特征。(2)PCR 分别获得 rDNA-ITS 序列 1 652 bp、核糖体大亚基序列 660 bp 和翻译延伸因子序列 545 bp，提交至 NCBI，登录号分别为 ON129554、ON129553 和 ON155840。（3）纤维素酶和半纤维素酶在有/无松木屑条件下，外切β-葡聚糖酶(CBH)、内切β-葡聚糖酶(EG)和β-葡萄糖苷酶(BGL)最高分泌量分别为 16～17、32～35、36～37 U·mL^{-1}；木聚糖酶、甘露聚糖酶和α-葡萄糖苷酶最高分泌量分别为 28～38、280～342、9～11 U·mL^{-1}；锰过氧化物酶(MnP)、漆酶(Laccase)、木素过氧化物酶(LiP)这 3 种木质素降解酶在 4 种不同培养液中都有微弱的酶活性。综上表明，该研究结合形态学与分子鉴定，明确了野生茯苓 YX1 的分类地位，与褐腐菌在亲缘关系上既有联系又存在遗传差距，测定结果显示木质纤维素酶中的酶活大小依次为甘露聚糖酶>木聚糖酶>BGL>EG>CBH>α-葡萄糖苷酶>LiP>MnP>Laccase，纤维素酶和半纤维素酶酶活之间存在显著差异(P<0.05)，本研究为茯苓产生木质纤维素降解酶系的降解机制提供了基础酶学参考。

关键词：茯苓，ITS 序列，纤维素酶，半纤维素酶，木质素降解酶

中图分类号： Q945.8　　**文献标识码**：**A**　　文章编号：

Identification of wild *Wolfiporia cocos* and studies on its lignocellulolytic enzymes

QIN Wen[1], YIN Liwei[1*], HU Ting[1], YANG Chuncheng[1], WU Ling[2], HUANG Zhu[1], HU Yanan[1]

(1. *College of Life Sciences*, *Anqing Normal University*, *Provincial Key Laboratory of Biodiversity Study and Ecology Conservation in Southwest Anhui*, Anqing 246133, Anhui, China; 2. *College of Chemistry and Chemical Engineering*, *Anqing Normal University*, *Anhui Key Laboratory of Functional Coordination Compounds*, Anqing 246133, Anhui, China)

Abstract: In order to reveal the effects of *Wolfiporia cocos* lignocellulolytic enzymes and culture methods on its main enzymes, the main lignocellulolytic enzymes of *W.cocos* were determined in this study. Firstly, the microscopic observation of the culture characteristics of the wild *W. cocos* strains was carried out; then three pairs of primers were used for PCR amplification to carry out phylogenetic identification; The dominant strain YX1 was screened by qualitative culture and finally the activities of cellulase, hemicellulase and ligninolytic enzymes under different conditions were determined by microplate reader. The results were as follows: （1） Three morphological characteristics: mycelium, fruiting body and sclerotium of *W. cocos*;（2）PCR obtained rDNA-ITS sequence of 1 652 bp, ribosomal large subunit sequence of 660 bp and translation elongation factor sequence of 545 bp, and submitted to NCBI，accession numbers are ON129554, ON129553, and ON155840, respectively;（3）

基金项目：国家自然科学基金(22005004)；安徽省教育厅重点项目(KJ2019A0559)(KJ2020A0516)；安庆师范大学 2021 年度“国家级大学生创新创业训练计划”项目(202110732050S) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(22005004);Natural Science Foundation of Anhui Province Education Department(KJ2019A0559)(KJ2020A0516); Anqing Normal University 2021“National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Plan”Project (202110732050S)]。

第一作者：覃雯(1998-)，硕士研究生，研究方向为生态学，(E-mail) donotBshy@163.com。

***通信作者**：尹立伟，博士，副教授，研究方向为真菌生物学，(E-mail) kaixinliwei@163.com。

The highest secretion of exo-β-glucanase(CBH), endo-β-glucanase(EG) and β-glucosidase(BGL) in the presence or absence of sawdust was 16 - 17, 32 - 35, 36 - 37 U·mL^{-1}； The maximum secretion of xylanase, mannanase and α-glucosidase was 28 - 38, 280 - 342, 9 - 11 U·mL^{-1}.The three ligninolytic enzymes Manganese peroxidase (MnP), Laccase (Laccase), and Lignin peroxidase (LiP) had weak enzymatic activities in four different cultures. In conclusion, this study combines morphological and molecular identification to clarify the taxonomic status of YX1, which has both a relationship and a genetic gap with brown rot fungi.The results finally showed that the magnitude of enzymatic activities in lignocellulases were in the order of mannanase > xylanase > BGL> EG > CBH > α-glucosidase > LiP > MnP > Laccase, and there were significant differences between cellulase and hemicellulase enzymatic activities (P<0.05). This study provides a basic enzymatic reference for the degradation mechanism of the lignocellulolytic enzymes system produced by *W.cocos*.

Key words： *Wolfiporia cocos*, ITS, cellulase, hemicellulase, ligninolytic enzymes

木质纤维素降解酶（lignocellulolytic enzymes）是分解木质纤维素主要的降解酶系，木质纤维素是地球上数量最为丰富且可再生的自然资源之一，全球每年可产生 1.11×10^{11} 亿吨木质纤维素(Tadesse & Luque, 2011)，木质纤维素的生物降解是一个高度复杂的过程，它涉及众多酶系的参与，木质纤维素降解酶可低消耗、低污染、高效率地转化利用自然界中的生物质能源(Macdonald et al., 2011；杨立霞等, 2016a)，为了更好地利用木质纤维素，因此，国内外学者们开始关注木质纤维素降解酶的研究与应用。

茯苓（*Wolfiporia cocos*）是一种木材褐腐真菌，又称玉灵、茯灵、万灵桂、茯菟等，大多寄生在马尾松（*Pinus massoniana*）或赤松（*P. densiflora*）等树种的根上(王晓霞, 2012)。木质纤维素酶是多组分的复合酶系统，在降解木质纤维素时起催化作用，既包括与纤维素和半纤维素降解相关的水解酶类，又包括与木质素降解相关的氧化酶类。纤维素酶（cellulase, Cels）是一类能够水解纤维素的*β*-D-糖苷键并生成葡萄糖的多组分酶的总称，它们能够分泌一系列的外切*β*-葡聚糖酶（exo-*β*-glucanase, CBH）、内切*β*-葡聚糖酶（endo-*β*-glucanase, EG）和*β*-葡萄糖苷酶(*β*-glucosidase, BGL)（Okal et al., 2020)。半纤维素酶(hemicellulase, Hcels）是一个复杂的酶系，主要包括木聚糖酶（xylanase）、甘露聚糖酶（mannanase）和*α*-葡萄糖苷酶(α-glucosidase)等多种酶（高薇薇, 2017；Méndez-Líter et al., 2021）。与木质素降解相关的氧化酶类主要包括锰过氧化物酶（manganese peroxidase，MnP）、木素过氧化物酶（lignin peroxidase，LiP）、漆酶（laccase，Lac）等（ Upendra et al., 2011）。Yoon 和 Kim（2015）研究发现褐腐菌癞拟层孔菌（*Fomitopsis palustris*）能同时产生 3 种主要的纤维素酶（内切*β*-葡聚糖酶、外切*β*-葡聚糖酶和*β*-葡糖苷酶），并能降解结晶纤维素。谢君等（2007）报道侧耳（*Pleurotus* sp.2）和粗毛栓菌（*Trametes gallica*）在液体培养基中能够产生很强的木质纤维素降解酶活力且产酶速度较快。安琪等（2015）研究发现在不同碳源、氮源条件下培养金针菇（*Flammulina velutiper*）对其羧甲基纤维素酶、木聚糖酶和漆酶活力均有显著影响。篱边粘褶菌（*Gloeophyllum saepiarium*）能分泌淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、木质素酶、果胶酶、蛋白酶、脂肪酶、麦芽糖酶、粘胶酶及尿素酶等 20 多种酶，在一系列复合酶的参与及协同作用下，将极其复杂的植物细胞壁物质分解为简单的碳水化合物（Sista Kameshwar & Qin, 2020）。为了更好的开发与利用茯苓优良菌系，探究茯苓木质纤维素复合酶中的主要酶系，探索木质纤维素酶系能够有效降解木质纤维素资源，加速

茯苓菌丝降解速率，缩短菌核形成周期，促进茯苓菌核增产增收。本研究以茯苓为研究对象，研究其木质纤维素复合酶中主要酶系差异及酶活性规律，研究拟解决以下两个问题：（1）茯苓木质纤维素降解酶能否通过最佳培养基及诱导条件产生纤维素酶、半纤维素酶、木质素降解酶，及各酶类间有何差异？（2）茯苓木质纤维素降解酶能否通过不同底物的诱导来提高产酶能力及影响产酶规律？以便为今后木质纤维素相关酶的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

野生茯苓菌株（*Wolfiporia cocos*）于 2020 年 2 月，采自安徽省安庆市岳西县中关镇请寨村林区（北纬 30°85'，东经 116°35'）腐朽的松树桩下茯苓菌核，经分离鉴定后现保存在安庆师范大学动植物检疫实验室 4 ℃冰箱内，并进行甘油保藏。液体茯苓菌丝 YX1 保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC NO：M 2021434。

1.2 培养基

固体 PDA 培养基：去皮土豆 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂粉 17 g，KH_2PO_4 3 g，$MgSO_4·7H_2O$ 1.5 g，定容至 1 000 mL，121 ℃高压灭菌 30 min，用于茯苓菌丝的培养。

刚果红初筛培养基：羧甲基纤维素钠 2 g，$MgSO_4·7H_2O$ 1.88 g，KH_2PO_4 0.5 g，蛋白胨 2 g，琼脂粉 15 g，定容至 1 000 mL，121 ℃高压灭菌 30 min 后备用，待菌落生长平皿 5 cm 时，向培养基中加入 1 $mg·mL^{-1}$ 刚果红溶液，染色 1 h，弃去染液后，加入 1 $mol·L^{-1}$ NaCl 溶液，洗涤 1 h 后观察结果，此培养基用于纤维素分解菌的定性培养和鉴别。

纤维素酶种子培养基：蛋白胨 20 g，羧甲基纤维素钠 10 g，NaCl 5 g，KH_2PO_4 1 g，用于纤维素酶产酶种子菌摇瓶培养。

纤维素酶产酶培养基：蛋白胨 10 g，酵母膏 15 g，羧甲基纤维素钠 10 g，NaCl 5 g，KH_2PO_4 1 g，pH = 7 定容至 1 000 mL，用于纤维素酶产酶菌摇瓶培养。

LNAS 培养基：液体培养基的制备，根据四组不同分组需求选择对应矿质溶液（Kirk et al., 1978; Hatakka &Uusi-Rauva, 1983 ）。分别为以下四种培养基：不添加 $MnSO_4·H_2O$ 的矿物元素溶液（无锰，A）；添加 $MnSO_4·H_2O$ 的矿物元素溶液（含锰，B）；添加 2 g 松木屑的矿物元素溶液（加木屑，C）；添加 2, 6-二甲氧基苯酚的矿物元素溶液（加 2,6-DMP，D），用于木质素降解酶的检测。

1.3 序列扩增与系统发育分析

提取茯苓基因组 DNA，灭菌刀具刮取约 20 mg 新鲜菌丝，采用细胞破壁仪充分研磨粉末至细胞破壁，按照真菌试剂盒（UNIQ-10 柱式）说明书提取茯苓 YX1 基因组 DNA。PCR 采用通用引物对（吴悦妮等, 2020），分别为 ITS1:（5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’）和 ITS4:（5’-TCCGCTTATTGATATGC-3’）、NL1:（5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’）和 NL4:（5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’）、EF1-688F:（5’-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3’）和 EF1-1251R:（5’-CCTCGAACTCACCAGTACCG-3’）。PCR 扩增体系为：模板 DNA 0.50 μL，引物 10 $μmol·L^{-1}$ 各 1.75 μL，2×Rapid Taq Master Mix 25.00 μL，ddH_2O 定容至 50.00 μL，以上三种 PCR 扩增反应条件相同：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，52～55 ℃退火 45 s，72 ℃ 2 min，共 35 个循环，最后 72 ℃ 10 min，终止 4 ℃。PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测并回收测序，将获得的 YX1 序列分别提交至 NCBI 的 GenBank，进行 BLAST 比对，运用分析软件 MEGA6.1 中的 NJ 法构建系统发育树(Fan et al., 2015；张绍刚等, 2021)。

1.4 菌株培养

木质纤维素降解酶系皆采用固体 PDA 培养基进行培养，待菌丝即将长满平板时，使用打孔器进行打孔，每瓶种子培养基中含 5 个孔径为 1 cm 菌饼，28 ℃、150 $r·min^{-1}$ 于恒温振荡培养箱内培养，纤维素和半纤维素降解酶系测定中，酶液制备皆为待种子培养基内菌丝生长成熟，用移液枪吸取接种至纤维素酶产酶培养基，接种量为每瓶 1.5 mL（邹荣松, 2019），木质素降解酶系检测使用分别添加上文 1.2 四种不同

底物的 LNAS 培养基。在超净工作台内进行提取培养液即胞外酶液，纤维素酶系持续吸取至 12 d，木质素酶系持续吸取至 21 d，每次使用移液枪定时定量吸取培养液 1.5 mL，提取的粗酶液离心 13 200 $r\cdot min^{-1}$，5 min，并进行酶活测定。

1.5 酶活测定

利用酶标仪（Multiskan GO 全波长酶标仪）测定 310～540 nm 波长范围下酶活力的大小。葡萄糖标准曲线的制作：配制 1.0、0.75、0.5、0.25、0 $mg\cdot mL^{-1}$ 葡萄糖标准液。D 木糖标准曲线的制作：将 10 $mg\cdot mL^{-1}$ D 木糖标准液使用蒸馏水稀释至 1.0、0.8、0.6、0.4、0 $mg\cdot mL^{-1}$ 即为标准稀释液。酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 540 nm，蒸馏水调零。以标准稀释液为横坐标（x），以其对应的ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$，将ΔA 测定带入公式中得到 x（$mg\cdot mL^{-1}$）。绘制葡萄糖标准曲线，得到回归方程为 $y = 0.841\ 6x - 0.023\ 6$，相关系数 $R^2 = 0.996\ 5$，如图 1：A；绘制 D 木糖标准曲线，得到回归方程为 $y = 0.683\ 2x - 0.008\ 4$，相关系数 $R^2 = 0.996\ 7$，如图 1：B。

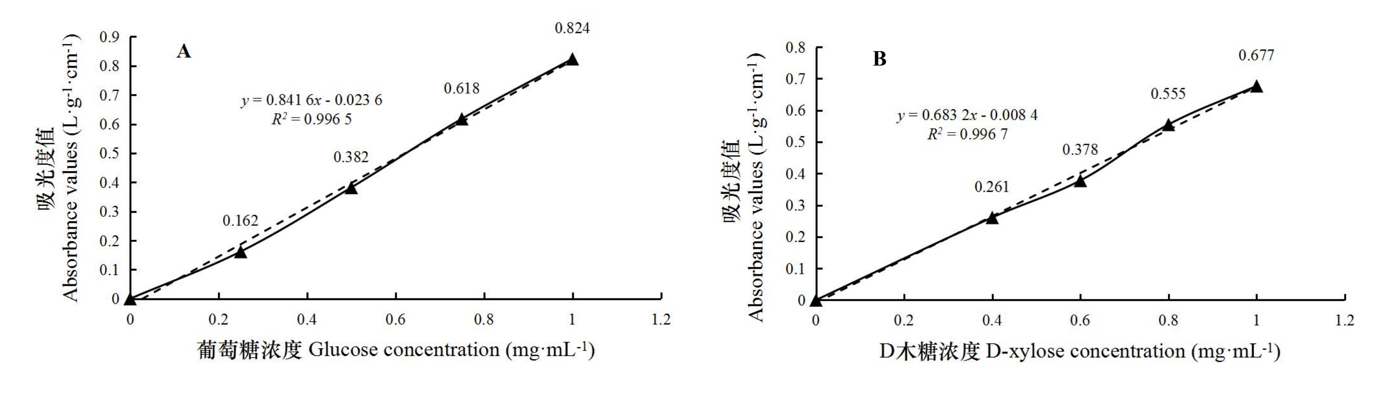


图 1 茯苓菌葡萄糖和 D 木糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of Glucose and D-xylose from *Wolfiporia cocos*

1.5.1 纤维素酶活力测定

酶标仪检测外切β-葡聚糖酶(CBH)、内切β-葡聚糖酶(EG)和β-葡萄糖苷酶(BGL)的活性，梯度试验后最终采用 150 μL 反应体系。首先，取粗酶液的量依次为 25、50、50 μL；其次，取各自不同体积底物溶液，检测 CBH 所采用的底物溶液为 2 %微晶纤维素溶液 50 μL，检测 EG 所采用底物溶液为 1 %羧甲基纤维素钠溶液 25 μL，检测 BGL 所采用底物溶液为 1 %水杨苷溶液 25 μL；放入 50 ℃恒温水浴锅中水浴反应，反应时间各依次为 120、30、30 min；再次，加入 DNS 显色液均为 75 μL；最后，混匀后沸水浴时长均为 5 min，冷却后测定波长在 540 nm 处的吸光度值（高微微, 2017）。酶活单位定义为每分钟分解特定底物释放出 1 μmol 还原糖所需的酶量。采用无木屑和填加松木屑（*P. massoniana*）为对照处理，分别检测第 2、4、6、8、10、12 d 的酶活力，各设置 3 个重复。

1.5.2 半纤维素酶活力测定

酶标仪检测木聚糖酶、甘露聚糖酶、α-葡萄糖苷酶活性，梯度试验最终采用 200 μL 反应体系，首先，取粗酶液的量依次为 67、67、6.7 μL；其次，各取自不同底物溶液，检测木聚糖酶所采用的底物溶液为 0.8 %的木聚糖溶液 33 μL，检测甘露聚糖酶所采用底物溶液为 0.8 %的甘露聚糖溶液 33 μL，检测α-葡萄糖苷酶所采用底物溶液为 0.4 %的 pNPG 溶液 60 μL；50 ℃恒温水浴锅中水浴反应时间依次为 30、30、60 min；再次，使反应终止，木聚糖酶、甘露聚糖酶均使用 DNS 显色液终止反应，加入 DNS 试剂 100 μL，最后，混匀沸水浴 5 min，冷却后测定波长在 540 nm 处的吸光度值（高微微, 2017）。α-葡萄糖苷酶加入 1 $mol\cdot L^{-1}$ Na_2CO_3 溶液 66.7 μL 终止反应，振荡混匀后测定波长在 410 nm 处的吸光度值。酶活单位定义为每分钟分解底物所释放出 1 μmol 还原糖所需的酶量。采用无木屑和填加松木屑为对照处理，分别检测第 2、4、6、8、10、12 d 的酶活力，各设置 3 个重复。

1.5.3 木质素降解酶活力测定

酶标仪检测锰过氧化物酶（MnP）、漆酶（Laccase）、木质素过氧化物酶（LiP）活性，梯度试验后最终采用 100 μL 反应体系。3 种酶分别采用 2,6-DMP、藜芦醇（VA）、ABTS 为底物，分别测定吸光度在

470、420、310 nm 处 1～3 min 内的变化值。酶活单位（U）：上述条件下，每分钟催化 1 μmol 2,6-DMP，ABTS 或 VA 所需的酶量（池玉杰和闫洪波, 2009）。计算中的 ε470=49 600（$mol·L^{-1}cm$）$^{-1}$，ε420=36 000（$mol·L^{-1}cm$）$^{-1}$，ε310=9 300（$mol·L^{-1}cm$）$^{-1}$。

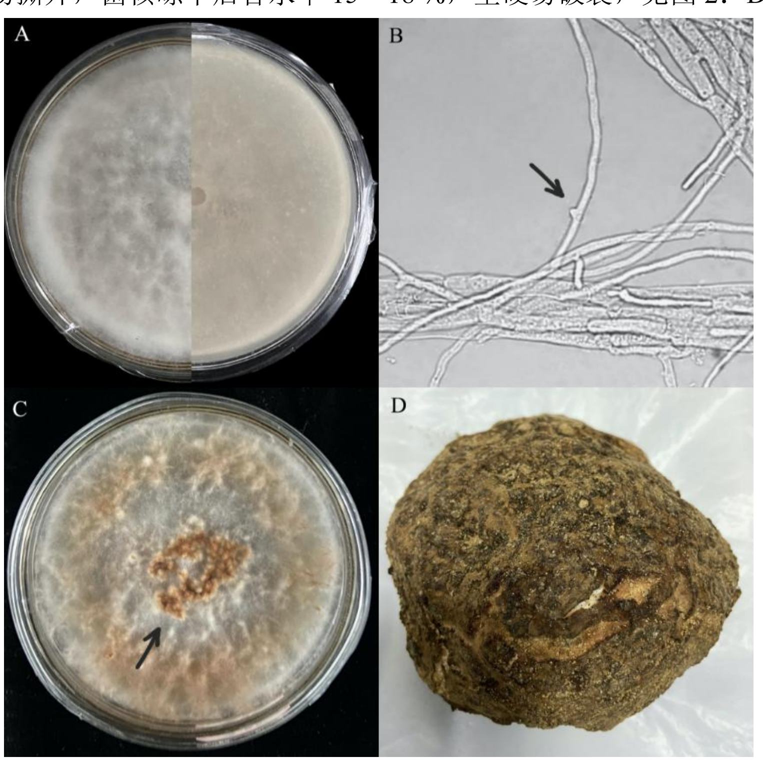
1.6 数据处理

采用 Microsoft Excel 软件对数据进行处理和分析，利用 SPSS 26.0 对数据进行方差分析并评价其差异显著性，使用 Origin2018 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 茯苓 YX1 的生物学特性

茯苓 YX1 在 PDA 培养基上培养 4～5 d，于光学显微镜观察菌丝的正反面，见图 2：A 所示，茯苓菌丝体呈白色绒毛状，菌丝直径 2～5 μm，菌丝光滑无色，多分支，有横隔膜，偶见锁状联合，见图 2：B 所示。菌丝生命力旺盛 5～7 d 可长满平皿，转移至光照培养箱中，进行光暗交替培养，28 d 后菌丝衰退呈褐色，子实体呈蜂窝状，平铺聚集群生，见图 2：C 所示。茯苓 YX1 菌核（140～150）mm ×（170～180）mm，呈不规则椭球形等，深褐色、大小不均匀、表面粗糙呈瘤状皱缩、有弹性生命力强，菌核内部呈白色粉质颗粒状，质软，易撕开，菌核晾干后含水率 15～18 %，坚硬易破裂，见图 2：D 所示。



A.菌株 YX1 菌落形态；**B**.锁状联合；**C**.茯苓子实体；**D**.茯苓菌核。

A. Colony morphology of strain YX1；**B**. Clamp connection；**C**. Fruit bodies；**D**. Sclerotium.

图 2 茯苓 YX1 显微结构及生物学培养特性

Fig.2 Microstructure and biological culture characteristics of *Wolfiporia cocos* YX1

2.2 茯苓 YX1 的 3 条序列与系统发育分析

茯苓（*W. cocos*）YX1 的 PCR 产物测序分别得到 1 652、660、545 bp 的核苷酸序列，将该序列提交到 GenBank（NCBI 登录号分别为：ON129554、ON129553、ON155840，鉴定结果表明：茯苓 YX1（ON129554）的 rDNA-ITS 序列为 1 652 bp：1～5 bp 为 18S rRNA 序列，6～1 005 bp 为 ITS1 序列，1 006～1 167 bp 为 5.8S rRNA 序列，1 168～1 626 bp 为 ITS2 序列，347～508 bp 为 28S rRNA 序列；茯苓 YX1（ON129553）核糖体大亚基（LSU）序列为 1～660 bp；茯苓 YX1（ON155840）翻译延伸因子（TEF）的 CDS 编码序列

共 545 bp 分别为 1～129 bp，179～320 bp，380～545 bp 序列，根据 3 条茯苓 YX1 序列，采用 MEGA 6.1 软件构建褐腐菌系统发育树，运用 NJ 聚类法分析，从图 3 中可知，系统发育树分为内部转录间隔区（ITS）、核糖体大亚基（LSU）、翻译延伸因子（TEF）三部分序列，茯苓菌（*W.cocos*）YX1 与 22 个茯苓菌株都较为亲密并聚类在一起，而 *Pachyma hoelen*、*Wolfiporia cocos*、*Poria cocos* 和 *Macrohyporia cocos* 是茯苓菌的同物异名菌株。茯苓菌种间的遗传距离最为接近，四个同物异名的茯苓 ITS、LSU、EF 序列聚类在一起，另外 3 株褐腐菌桦剥管菌（*Piptoporus betulinus*） Pt-2 、277、12 388 菌株为外组群菌株为参照，分别与茯苓菌 ITS、LSU、TEF 的区间序列既有同源又有所差距。在系统发育树上区分了茯苓 ITS 序列、LSU 序列、TEF 序列，但它们之间又有遗传联系，NCBI 中同源性达 90%以上，可以明确岳西野生茯苓菌（*W. cocos*）YX1 就是茯苓属下的茯苓菌株。

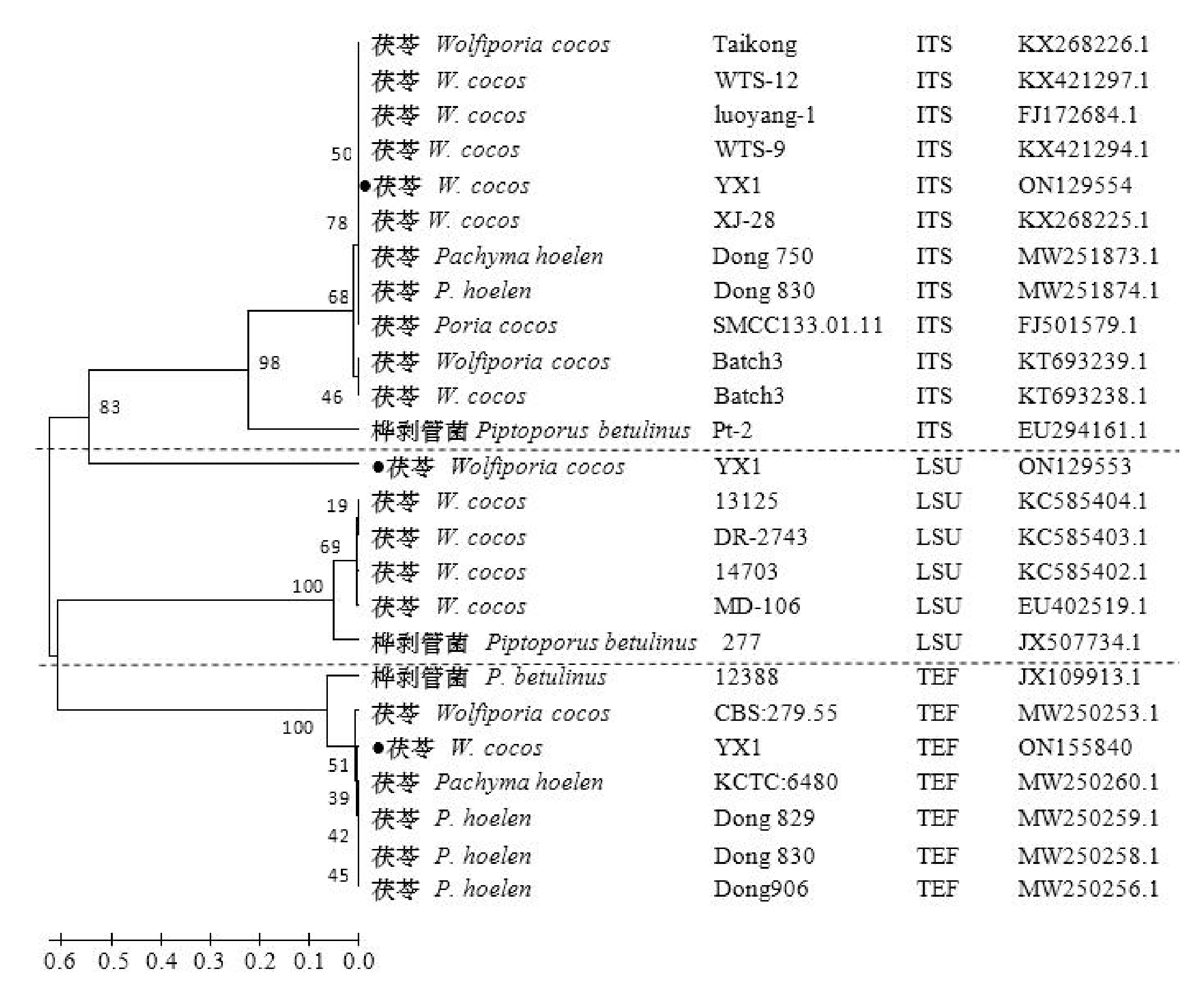


图 3 采用 NJ 法构建茯苓菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic trees from neighbor-joining of *Wolfiporia cocos* YX1

2.3 茯苓木质纤维素酶的酶活

2.3.1 纤维素酶活检测结果

茯苓菌在有/无松木屑 2 种培养方式下，检测 YX1 纤维素酶中β-葡萄糖苷酶(BGL)和内切β-葡聚糖酶(EG)的酶活相当，变化范围在 32～37 U·mL^{-1} 之间，而外切β-葡聚糖酶(CBH)变化范围在 16～17 U·mL^{-1} 之间，见图 4。由图可知，在有/无松木屑 2 种培养方式下 2 d 时 CBH 酶活最大值分别为 14.48 U·mL^{-1} 和 15.87 U·mL^{-1}，第 4 d 酶活最大值分别为 16.71 U·mL^{-1} 和 16.82 U·mL^{-1}；EG 第 2 d 酶活最大值分别为 32.6 U·mL^{-1} 和 29.35 U·mL^{-1}，第 8 d 含松木屑酶活达到最大值 34.71 U·mL^{-1}，而不含松木屑的培养方式第 12 d 酶活达到最大值

32.245 U·mL^{-1}；BGL 在有/无松木屑 2 种培养方式下第 2 d 时酶活分别为 33.03 U·mL^{-1} 和 30.46 U·mL^{-1}，第 8 d 时含松木屑酶活达到最大值 36.81 U·mL^{-1}，逐渐降低，而不含松木屑的培养方式第 10 d 酶活达到最大值 36.7 U·mL^{-1}。从纤维素酶的整体酶活对比来看，CBH<EG<BGL。

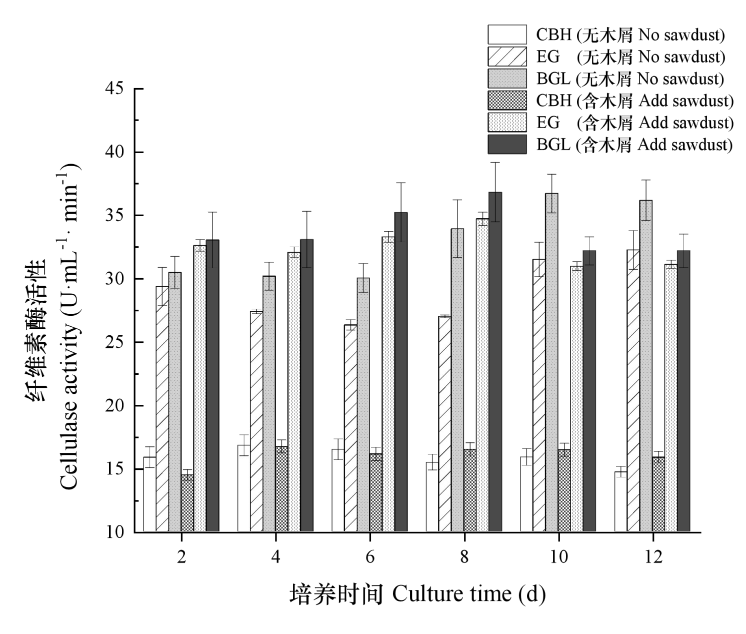


图 4 茯苓菌 YX1 的纤维素酶活性

Fig. 4 Cellulase activity of *Wolfiporia cocos* YX1

方差分析表明茯苓 3 种纤维素酶外切β-葡聚糖酶(CBH)、内切β-葡聚糖酶(EG)和β-葡萄糖苷酶(BGL)活性在有/无木屑培养方式和培养时间上表现为显著差异（P<0.05），其中的 3 种酶之间存在极显著差异（P<0.001）；在主体间效应的检验中，三种酶均值分别为 14.51 U·mL^{-1}、30.71 U·mL^{-1} 和 33.33 U·mL^{-1}，培养方式 F= 5.53 和培养时间 F= 2.62，均达到显著差异，三种酶 F= 127.53，均达到极显著差异（表 1）。

表 1 茯苓菌3种纤维素酶活性方差分析结果

Table1 Analysis of variance results of three cellulase activities from *Wolfiporia cocos*

菌种 YX1 Strain	III 型平方和 III sum of squares	自由度 Degree freedom	偏 Eta 方 Eta squared	F F-test	*P* *P* value
截距 Intercept	74 033.03	1	0.99	2 523.28	0.00
培养方式 Culture methed	162.14	1	0.32	5.53 *	0.37
3 种酶 Three enzymes	7 483.63	2	0.99	127.53 ***	0.00
培养方式 × 3 种酶 Culture methed × Three enzymes	36.26	2	0.09	0.62	0.56
培养时间 Culture time	38.28	5	0.70	2.62 *	0.05
误差 Error	352.08	12			

注：*表示显著差异；**表示极显著差异。下同。

Note：* indiactes significant differences; ** indiactes extremely significant differences. The same below.

2.3.2 半纤维素酶活检测结果

茯苓菌在有/无松木屑 2 种培养方式下，检测 YX1 半纤维素酶中甘露聚糖酶（mannanase）活性分泌量最高，变化范围在 280 ~ 342 U·mL^{-1} 之间，木聚糖酶（xylanase）变化范围在 28 ~ 38 U·mL^{-1} 之间，α-葡萄

糖苷酶（α-glucosidase）变化范围在 9～11 U·mL^{-1} 之间，见图 5。 由图可知，在有/无松木屑 2 种培养方式下第 2 d 时木聚糖酶活最大值分别为 20.89 U·mL^{-1} 和 19.24 U·mL^{-1}，第 8 d 时酶活分别达到酶活最大值 37.31 U·mL^{-1} 和 28.79 U·mL^{-1}，第 10 天酶活最大值分别为 21.9 U·mL^{-1} 和 15.37 U·mL^{-1}；甘露聚糖酶在有/无松木屑 2 种培养方式下第 2 天酶活分别为 275 U·mL^{-1} 和 217.49 U·mL^{-1}，第 8 天时均达到酶活最大值，分别为 341.28 U·mL^{-1} 和 280.74 U·mL^{-1}，第 10 天酶活最大值分别为 272.04 U·mL^{-1} 和 229.09 U·mL^{-1}；α-葡萄糖苷酶在有/无松木屑 2 种培养方式下第 2 天，酶活分别为 9.23 U·mL^{-1} 和 8.84 U·mL^{-1}；第 8 天时酶活最大值分别为 10.66 U·mL^{-1} 和 9.88 U·mL^{-1}，第 10 天 酶活 8.84 U·mL^{-1} 和 8.77 U·mL^{-1}。实验表明各个酶活力之间存在变化差异，从半纤维素酶的整体酶活对比来看，α-葡萄糖苷酶<木聚糖酶<甘露聚糖酶活性。

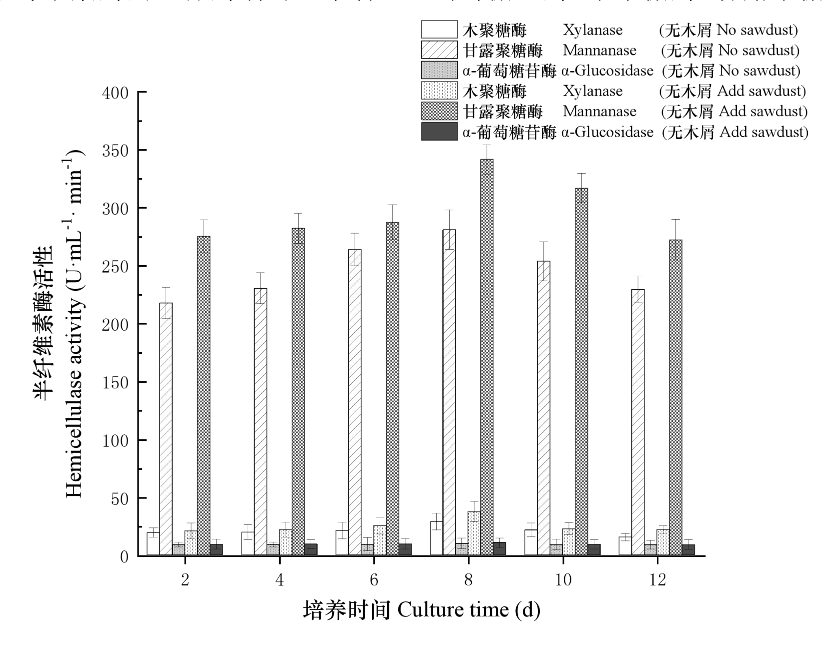


图 5 茯苓菌 YX1 的半纤维素酶活性

Fig 5 Hemicellulase activity of *Wolfiporia cocos* YX1

方差分析表明茯苓 3 种半纤维素酶木聚糖酶、甘露聚糖酶和α-葡萄糖苷酶活性在有/无木屑的培养方式上表现为显著差异（P<0.05），培养时间表现为极显著差异（P<0.001），其中 3 种酶之间存在极显著差异（P<0.001），在主体间效应的检验中，三种酶均值分别为 22.94 U·mL^{-1}、270.7 U·mL^{-1} 和 9.29 U·mL^{-1}，培养方式 F= 5.53 和培养时间 F= 2.62 均达到显著差异，三种酶 F= 127.53 均达到极显著差异（表 2）。

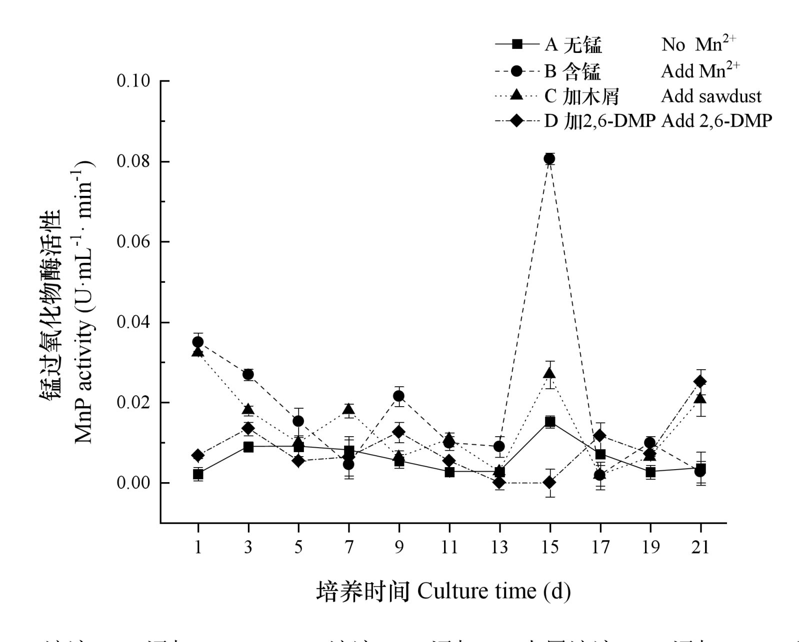
表 2 茯苓菌3种半纤维素酶活性方差分析结果

Table 2 Analysis of variance results of three hemicellulase activities from *Wolfiporia cocos*

菌种 YX1 Strain	III 型平方和 III sum of squares	自由度 Degree freedom	偏 Eta 方 Eta squared	F F-test	*P* *P*
截距 Intercept	1 101 149.2	1	0.99	2 523.28	0.00
培养方式 Culture methed	8 831.29	1	0.51	12.576*	0.004
3 种酶 Three enzymes	1 558 901.87	2	0.99	1 109.983***	0.00
培养方式 ×3 种酶 Culture methed ×Three enzymes	13 730.31	2	0.09	0.62	0.003
培养时间 Culture time	9 037.53	5	0.45	9.65***	0.00
误差 Errors	8 426.63	12			

2.3.3 木质素降解酶活检测结果

茯苓菌在 4 种不同底物的培养条件下，检测 YX1 锰过氧化物酶(MnP)酶活变化范围在 0 ~ 0.1 U·mL^{-1}之间，在培养条件 A，提取的酶液检测到第 15 天的 MnP 酶活 0.015 U·mL^{-1}；在培养条件 B，提取的酶液检测到第 15 天达到 MnP 最大分泌量高峰 0.081 U·mL^{-1}；在培养条件 C，提取的酶液检测到第 15 天的 MnP 活性 0.027 U·mL^{-1}，达到分泌高峰；在培养条件 D，提取的酶液检测到第 21 天的 MnP 酶活达到分泌高峰，但只有 0.025 U·mL^{-1}；对比 A 不含 Mn^{2+}和 B 含 Mn^{2+}两种培养条件的结果表明，MnP 受到 Mn^{2+}的影响，但 MnP 酶活性变化不大，均在第 15 天 达到分泌高峰；Mn^{2+}是茯苓菌产生 MnP 的诱导因子之一，MnP 酶活变化规律一致；对比 C 加木屑和对照组 A 不含 Mn^{2+}相比较，受木屑影响不明显；加 2,6-DMP 培养条件 D，在 21 天 内 MnP 活性规律不明显，21 天之后加木屑培养条件 C 和加 2,6-DMP 培养条件 D 仍然存在 MnP 酶的活性变化。21 天内茯苓菌 4 种培养条件产生 MnP 的情况，见图 6。



注：A. 不添加 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 溶液；B. 添加 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 溶液；C. 添加 2 g 木屑溶液；D. 添加 2, 6-二甲氧基苯酚溶液。下同。

Note： A. Without $MnSO_4 \cdot H_2O$ solution; B. With $MnSO_4 \cdot H_2O$ solution; C. With 2 g wood sawdust solution ; D. With 2,6-DMP solution. The same below.

图 6 茯苓菌 YX1 的锰过氧化物酶活性

Fig.6 MnP activity of *Wolfiporia cocos* YX1

茯苓菌在 4 种不同底物的培养条件下，检测 YX1 漆酶(Laccase)酶活变化范围在 0 ~ 0.04 U·mL^{-1}之间。在培养条件 A，提取的酶液检测到第 19 天 的 Laccase 活性 0.031 U·mL^{-1}；在培养条件 B，提取的酶液检测到第 7 天达到 Laccase 最大分泌量高峰 0.033 U·mL^{-1}；在培养条件 C，提取的酶液检测到第 9 天的 Laccase 活性 0.025 U·mL^{-1}；在培养条件 D，提取的酶液检测到第 9 天的 Laccase 活性只有 0.029 U·mL^{-1}；对比 A 不含 Mn^{2+}和 B 含 Mn^{2+}两种培养条件的结果表明，Mn^{2+}对产生茯苓菌 Laccase 酶没有太大变化；对比 4 种不同底物 Laccases 的酶活性都比较小，并且 Laccase 酶活性变化规律不明显。21 d 内茯苓菌在 4 种培养条件产生 Laccases 的情况，见图 7。

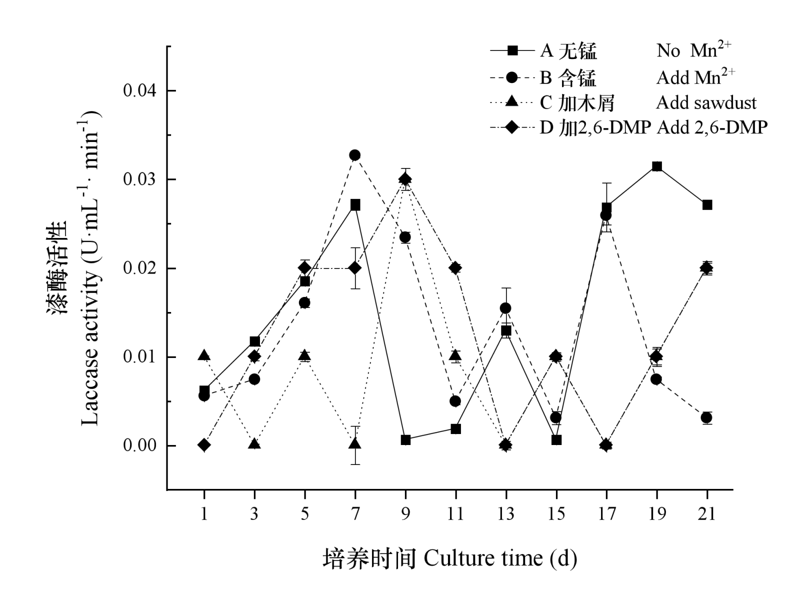


图 7 茯苓菌 YX1 的漆酶活性

Fig.7 Laccase activity of *Wolfiporia cocos* YX1

YX1 在 4 种不同底物的培养条件下，检测木素过氧化物酶(LiP)酶活变化范围在 0～0.2 U·mL^{-1}。在培养条件 A，提取的酶液检测到第 21 d 的 LiP 活性 0.023 U·mL^{-1}；在培养条件 B，检测到第 11 d 达到 LiP 最大分泌量高峰 0.109 U·mL^{-1}；在培养条件 C，检测到第 7 d 的 LiP 活性 0.104 U·mL^{-1}；在培养条件 D 检测到第 19 d 的 LiP 活性只有 0.067 U·mL^{-1}；对比 A 不含 Mn^2 和 B 含 Mn^{2+}两种培养液的检测结果表明，Mn^{2+}对产生 LiP 酶起到次要因素；虽然 Mn^{2+}有影响 LiP 酶活性变化，但比较微弱，对比 4 种不同底物 LiP 的酶活性都比较小，且 LiP 酶活性变化规律不明显。21 d 内茯苓菌在 4 种培养液中产生 LiP 的情况，见图 8。

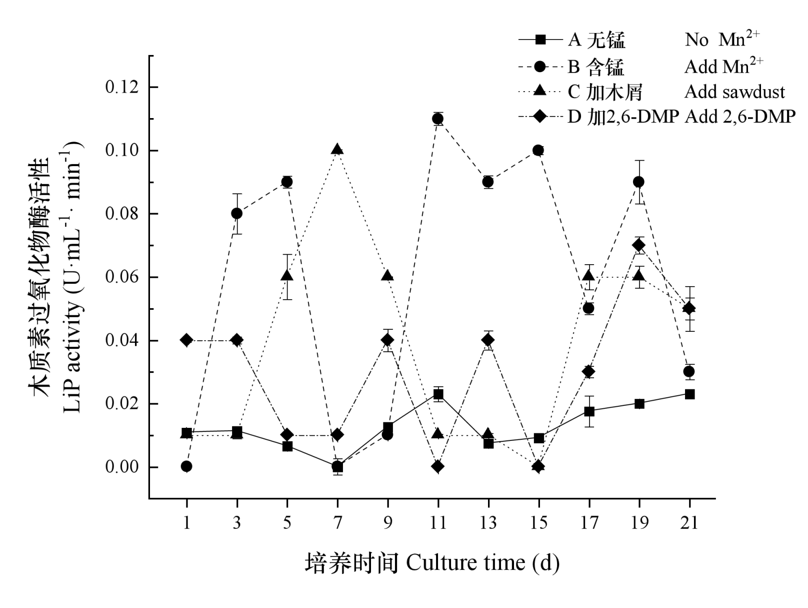


图 8 茯苓菌 YX1 的木素过氧化物酶活性

Fig.8 LiP activity of *Wolfiporia cocos* YX1

3 结论与讨论

3.1 野生茯苓鉴定

本研究以野生茯苓 YX1 为研究对象，从团聚的菌丝培养来看，菌丝有隔膜、偶见锁状联合现象，茯苓菌核也为茯苓菌丝团的一个休眠体。新鲜的菌核切开后茯苓肉为白色，也可做为母种或栽培种的结苓肉

引。结合分子生物学的鉴定，采用 3 对通用引物，从 ITS 区域序列、核糖体大亚基 （LSU）序列和翻译延伸因子 TEF 序列进行 PCR 产物分析，与桦剥管菌 Pt-2、277、12388 菌株同为褐腐菌，在亲缘关系上既有联系又有遗传差距。茯苓(*Pachyma hoelen*)、*Wolfiporia cocos*、*Poria cocos* 和 *Macrohyporia cocos* 有 4 种同物异名，在系统发育中它们之间联系紧密，依据 2008 年《菌物字典》第十版（Kirk et al., 2008）及参照最新编制八界系统的菌物分类学，茯苓 YX1（*Wolfiporia cocos*），隶属于担子菌门（Basidiomycota），蘑菇亚门（Agaricomycotina）蘑菇纲（Agaricomycetes），多孔菌目（Polyporales），拟层孔菌科（Fomitopsidaceae），茯苓属（*Wolfiporia*），茯苓（*W. cocos*）。

3.2 茯苓产纤维素酶和半纤维素酶

本研究前期对茯苓菌产纤维素酶做了定性培养，存在明显的透明圈现象，筛选出的 YX1 具有降解木质纤维素的能力，并做为定量培养研究菌株 YX1 进行木质纤维素酶活的测定。研究发现，纤维素酶和半纤维素酶在有/无松木屑为底物条件下，具有趋于一致的变化规律。培养方式中无木屑对照组与有木屑为底物的实验组相比，除外切β-葡聚糖酶(CBH)以外，内切β-葡聚糖酶(EG)、β-葡萄糖苷酶(BGL)均表现为有木屑实验组高于无木屑对照组，从纤维素酶活力之间对比来看，纤维素酶中 CBH<EG<BGL。半纤维素酶中甘露聚糖酶、木聚糖酶、α-葡萄糖苷酶均表现为有木屑实验组高于无木屑对照组，从半纤维素酶活力之间对比来看，半纤维素酶中甘露聚糖酶<木聚糖酶<α-葡萄糖苷酶。茯苓菌实验组的 3 种纤维素酶中 CBH 培养初期时酶活最大，这与前人研究结果一致（訾晓雪, 2015）。纤维素酶中 EG 和 BGL 酶活性均在第 8 d 达到分泌量的最高值，BGL 略高于 EG 的酶活，两种酶活比 CBH 高出 2 倍多。茯苓菌实验组的 3 种半纤维素酶中甘露聚糖酶比木聚糖酶活、α-葡萄糖苷酶高出 9～32 倍，与本研究结果一致（彭木, 2016; 杨立霞等, 2016b）。高微微（2017）研究 3 种褐腐菌与本研究茯苓的纤维素酶和半纤维素酶活相比，茯苓 YX1 均高于这 3 种红缘拟层孔菌（*Fomitopsis pinicola*）、桦剥管菌（*Piptoporus betulinus*）和黄伞（*Pholiota adiposa*）的产酶能力。

3.3 茯苓产木质素降解酶

茯苓是褐腐菌，主要产生纤维素酶和半纤维素酶，也能产生微弱的木质素降解酶活性。茯苓木质素降解酶中除漆酶(Laccase)之外，锰过氧化物酶(MnP)和木素过氧化物酶(LiP)均表现为有木屑实验组高于无木屑对照组，实验表明添加 Mn^{2+}和木屑为培养底物能够起到诱导作用。Chi 等（2007）研究虫拟蜡菌（*Ceriporiopsis subvermispora*）、平菇（*Pleurotus ostreatus*）和（*Physisporinus rivulosus*）等真菌共培养条件时 MnP 酶活性，在 7 d 之后检测到 MnP 活性最高达 25～250 $U{\cdot}mL^{-1}$，与前人研究结果相比，茯苓产 MnP 酶活比较微弱，4 种培养方式最高酶活仅为 0.015～0.081 $U{\cdot}mL^{-1}$。茯苓 Laccase 培养方式 A 和 B 相对比，培养方式 B 提前达到分泌高峰，但受到 Mn^{2+}的影响不大；培养方式 C 和 D，同是第 9 d 达到分泌高峰，与培养方式 A 不含 Mn^{2+}相比较，不受木屑所影响。池玉杰和闫洪波（2009）研究红平菇 4 种培养方式 Laccase 酶活最高达 36～205 $U{\cdot}L^{-1}$，在含 Mn^{2+}和无 Mn^{2+}条件下的酶活分泌情况，与本研究结果基本一致，说明 Laccase 酶活性分泌规律不明显，整体呈波动性变化，相比较茯苓 Laccase 酶活都比较微弱，最高酶活性仅为 0.025～0.032 $U{\cdot}mL^{-1}$。LiP 培养方式 A 和 B 相对比，LiP 受到 Mn^{2+}的影响，并且提前达到分泌高峰；培养方式 C，第 7 d 就达到分泌高峰，与培养方式 A 比较，结果表明以木屑为底物是 LiP 诱导条件之一；培养方式 D，第 19 d 的 LiP 活性达到分泌高峰。王茂成（2013）研究黑木耳、灵芝、灰树花和 J201 真菌产 LiP 酶均在第 9 d 达到产酶最高值分别为 121.6、143.5、111.6 和 145.2 $U{\cdot}mL^{-1}$，产酶规律都是以逐渐升高又逐渐降低，达到高峰后仍有产酶能力，这与本研究产 LiP 酶含 Mn^{2+}和加木屑的培养方式分泌规律相似，不同之处是达到最大产酶时间，相比较茯苓产 LiP 酶活都比较微弱，最高酶活仅为 0.017～0.109 $U{\cdot}mL^{-1}$。从茯苓木质素降解酶活力之间对比来看，木质素降解酶中 LiP>MnP>Laccase。由于茯苓产生比较微弱的木质素降解酶，故未对 MnP、Laccase 和 LiP 3 种酶活结果做进一步方差分析。从木质纤维素酶活力之间对比来看，木质素降解酶<纤维素酶<半纤维素酶活性。整体而言，以上结果表明茯苓菌具有分泌木质纤维素酶的能力，作为褐腐菌的茯苓仅仅只有微弱的木质素酶活性，多种酶之间均存在显著性差异（$P<0.05$）。

综上所述，野生茯苓菌的形态特征与分子生物学鉴定相结合，明确了茯苓的分类地位，揭示其木质纤维素酶系统的主要酶系及与培养条件等之间的联系，因此，该菌株可作为候选菌株进行深入研究。纤维素酶中 CBH 在培养初期时酶活达到最大量，半纤维素酶中α-葡萄糖苷酶在培养初期时酶活达到最大量，而木质素降解酶中的MnP 和 LiP 在培养后期达到分泌最大量。茯苓菌不断的分泌纤维素酶和半纤维素酶较多，分解前期过程中起到主导因素，而木质素降解酶为次要因素。吕聪（2008）研究发现茯苓分离纯化出 2 种 MnPI 和 MnPII 同工酶，优化后的 MnP 酶活高达 1 249.7 U·mL^{-1}。因此，后期提高茯苓菌木质纤维素酶的产酶效率，仍需进一步对产酶培养条件进行优化。另外，结果表明木质纤维素降解酶活力的大小差距可能与菌种特性、培养方式及诱导因素等条件有关，木质素降解酶的整体酶活性都较低，这可能因为本研究采用限氮培养基有关，与酶标仪检测的敏感性有关，也与褐腐菌茯苓菌本身的生长特性、菌核形成周期也有关。本研究结果还表明，茯苓产木质纤维素酶中的酶活大小依次为甘露聚糖酶>木聚糖酶>BGL>EG>CBH>α-葡萄糖苷酶>LiP>MnP>Laccase。从分解木质纤维素组成结构来看，除木质纤维素酶外，可能还包括着丰富的其它辅助酶系，它们以多种酶相互协同参与着木质纤维素的降解机制，催化着茯苓菌丝不断的聚集，吸收着基内、基外的营养，最后形成团聚的菌核，这些推测都有待进一步研究。

参考文献

AN Q, WU XB, WU B, et al., 2015. Effects of carbon and nitrogen sources on lignocellulose decomposition enzyme activities in *Flammulina velutipes*[J]. Mycosystema, 34(4): 761-771. [安琪，吴雪君，吴冰，等，2015. 不同碳源和氮源对金针菇降解木质纤维素酶活性的影响[J]. 菌物学报, 34(4)：761-771.]

CHI YJ, HATAKKA A, MAIJALA P, 2007. Can co-culturing of two white rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin degrading enzymes?[J]. Int Biodeterior Biodegrad, 59 (1) : 32-39.

CHI YJ, YAN HB, 2009. Detection on laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase in ligninolytic enzymes of *Pleurotus djamor*[J]. Sci Silv Sin, 45(12): 154-158. [池玉杰，闫洪波，2009. 红平菇木质素降解酶系统漆酶、锰过氧化物酶及木质素过氧化物酶的检测[J]. 林业科学，45(12)：154-158.]

FAN X , HYDE KD , LIU J , et al., 2015. Multigene phylogeny and morphology reveal *Phaeobotryon rhois* sp. nov. (Botryosphaeriales, Ascomycota)[J]. Phytotaxa, 205(2): 90.

GAO WW, 2017. The cellulase and hemicellulase activities of three brown rot fungi and their related gene diversity[D]. Harbin: Northeast Forestry University: 10-11; 15-21. [高微微，2017. 三种褐腐菌的纤维素与半纤维素酶活性及相关基因多样性[D]. 哈尔滨：东北林业大学：10-11；15-21.]

HATAKKA AI, UUSI-RAUVA AK, 1983. Degradation of 14C-labelled poplar wood lignin by selected white-rot fungi[J]. Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 17(4): 235-242.

KIRK PM, CANNON PF, DAVID WM, et al., 2008. Dictionary of the Fungi[M]. Commonwealth Mycological Institute. Tenth Edition. Trowbridge: Cromwell Press: 744.

KIRK TK, SCHULTZ E, CONNORS WJ, et al, 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Arch Microbiol, 117(3): 277-285.

LV C, 2008. The Research on Manganese Peroxidase of *Poria cocos* and the application[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology: 33-34. [吕聪，2008. 茯苓菌产锰过氧化物酶及其应用的研究[D]. 长沙：中南林业科技大学：33-34.]

MACDONALD J, DOERING M, CANAM T, et al., 2011. Transcriptomieresponses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood [J]. Appl Environ Microbiol, 77(10) : 3211 -3218.

MÉNDEZ-LÍTER JA, DE EUGENIO LI, NIETO-DOMÍNGUEZ M, et al., 2021, Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: A review[J]. Bioresource Technol, 324: 124623.

OKAL EJ, ASLAM MM, KARANJA JK, et al, 2020. Mini review: Advances in understanding regulation of

cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes[J]. Microb Pathog, 147 (2020): 1-8.

PENG M, 2016. Studies on the cellulase activity and proteomic of *Piptoporus betulinus* induced by different substrates[D]. Harbin: Northeast Forestry University: 21-22. [彭木，2016. 不同地点间桦剥管菌的木材降解相关酶及 TRAP 和 SRAP 标记的遗传多样性分析[D]. 哈尔滨：东北林业大学：21-22.]

SISTA KAMESHWAR AK, QIN W, 2020. Systematic metadata analysis of brown rot fungi gene expression data reveals the genes involved in Fenton's reaction and wood decay process[J]. Mycology, 11(1): 22–37.

TADESSE H, LUQUE R, 2011. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview[J]. Energy Environ Sci, 4(10): 3913-1929.

UPENDRA ND, PRIYANKA S, VEDA PP, et al.,2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases[J]. J Mol Catal B-Enzym, 68(2) :117-128.

WANG MC, 2013. Screening and identification of lignin degrading fungi and related enzymes activities research[D]. Chongqing: Southwest University: 18-19.[王茂成，2013. 木质素降解真菌的筛选鉴定及相关酶活性研究[D]. 重庆：西南大学：18-19.]

WANG XX, 2012. Preliminary study on the major biological characteristics of single basidiospore isolates of *Wolfiporia cocos*[D]. Wuhan: Anhui Agricultural University: 1. [王晓霞，2012. 茯苓单孢菌株主要生物学特性的初步研究[D]. 武汉：华中农业大学：1.]

WU YN, FENG K, LI SZ, et al., 2020. *In-silico* evaluation and improvement on 16S/18S/ITS primers for amplicon high-throughput sequencing[J]. Microbiology, 47(9): 2897-2912. [吴悦妮，冯凯，厉舒祯，等，2020. 16S/18S/ITS 扩增子高通量测序引物的生物信息学评估和改进[J]. 微生物学通报，47(9)：2897-2912.]

XIE J, HUANG QM, FENG L, et al., 2007. Comparative studies on lignocellulolytic enzyme production in liquid and solid cultures of white-rot fungi[J]. Mycosystema, 26(2): 266-272. [谢君，黄乾明，冯蕾，等，2007. 白腐菌液体和固体培养产生木质纤维素降解酶的比较研究[J]. 菌物学报，26(2)：266-272.]

YANG LX， MA XR， WANG YY, et al., 2016a. Biological characteristics of three white-rot fungi and genetic diversity of lignocellulose enzyme related genes[J]. Acta Ecol Sin, 36(7) : 2034-2043. [杨立霞，马欣然，王玉英，等，2016a. 三种白腐菌生物学特性与木质纤维素酶基因遗传多样性[J]. 生态学报，36 (7) ：2034-2043.

YANG LX, ZI XX, BADERIHU, et al., 2016b. Study on the properties of enzymes related to cellulose and hemicellulose degradation in *Piptoporus betulinus*[J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2016(23): 27-33. [杨立霞，訾晓雪，巴德日胡，等，2016b. 桦剥管菌纤维素和半纤维素降解相关酶性质研究[J]. 黑龙江畜牧兽医，2016(23)：27-33.]

YOON JJ, KIM YK., 2005. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*[J]. J Microbiol, 43(6): 487-492.

ZHANG SG, HU MJ, LI M, et al., 2021. Identification of the pathogen *Lasiodiplodia hormozganensis* causing *Ixora williamsii* dieback[J]. Acta Phytopathol Sin, 51(04):646-649. [张绍刚，胡美姣，李敏，等，2021. 矮龙船花枯梢病病原菌 *Lasiodiplodia hormozganensis* 的鉴定[J]. 植物病理学报，51(04)：646-649.]

ZI XX, 2015. Studies on the cellulase activity and proteomic of *Piptoporus betulinus* induced by different substrates[D]. Harbin: Northeast Forestry University: 10-12. [訾晓雪，2015. 不同底物诱导下桦剥管菌纤维素酶活和蛋白质组学研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学：10-12.]

ZOU RS, 2019. Isolation, mutagenesis, and fermentation technology of lignin and cellulose degrading microorganisms from green waste decomposing[D]. Beijing: Beijing Forestry University: 38. [邹荣松，2019. 园林绿化废弃物腐熟中木质素和纤维素降解菌的筛选诱变及扩繁[D]. 北京：北京林业大学：38.]